

Efeito do microagulhamento na retenção e permeação de ácido kójico em sistema de difusão vertical

Effect of microneedling in the retention and permeation of kojic acid in vertical diffusion system

Luana Nicolau Rogéri^{1*}; João Alberto Fioravante Tassinari¹

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Univates, 95914-014, Lajeado-RS, Brasil

**lrogeri@universo.univates.br*

Pesquisadores têm evidenciado que a pele íntegra pode ser utilizada com êxito como uma porta de administração sistêmica ou local de medicamentos e princípios ativos terapêuticos. Entretanto, a permeação e a retenção de substâncias na pele dependem de inúmeras variáveis, principalmente de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocado em um sistema farmacêutico apropriado e do tipo de pele analisada. Nesse sentido, pesquisadores buscam recursos que visam a aumentar a permeação e/ou a retenção de substâncias sobre a pele, sendo uma delas a técnica de microagulhamento, que tem como objetivo gerar múltiplas micropuncturas no tecido, minimizando sua barreira seletiva. Sendo assim, utilizamos o ácido kójico, por sua ação antioxidante e hipopigmentante. Diante disso, o objetivo deste estudo foi analisar a retenção e permeação do gel contendo ácido kójico 3% associado ao microagulhamento em sistema de difusão vertical. A pesquisa foi realizada a partir de uma célula de difusão vertical tipo Franz, com biomembrana de pele de suíno, simulando a pele humana. Foram realizados experimentos com e sem aplicação da técnica de microagulhamento, bem como a análise dos valores obtidos a partir de varreduras espectrofotométricas de 190 a 990 nm, nos tempos de 15 e 30 minutos. Os resultados calculados a partir da absorção do composto, que ocorrem nos comprimentos de onda próximos a 269 nm, elucidaram que o microagulhamento foi efetivo em incrementar a retenção do ativo, ampliando em 119% e 54% nos tempos de 15 e 30 minutos, respectivamente, nas camadas mais adjacentes da epiderme.

Palavras-chave: Microagulhamento, retenção, ácido kójico

Researchers have shown that intact skin can be successfully used as a gateway for systemic or local administration of medications and active therapeutic principles. However the permeation and retention of substances in the skin depend on several variables, mainly its physicochemical properties, its behavior when placed in an appropriate pharmaceutical system and the type of skin analyzed. Researchers seek resources that aim to increase the permeation and the retention of substances on the skin, being one of them the microneedling technique, which objective is to generate multiple micropunctures in the tissue, minimizing its selective barrier. Kojic acid is one of the elements most used in these cases due to its antioxidant and hypopigmentant action. The objective of this study was, therefore, to analyze the retention and permeation of the gel containing 3% kojic acid associated to the microneedling in a vertical diffusion system. This research was carried out from a vertical diffusion cell type Franz, with biomembrane of porcine skin, simulating the human skin. Experiments were performed with and without the application of the microneedling technique, as well as the analysis of the values obtained from spectrophotometric scans of 190 to 990 nm, in the times of 15 and 30 minutes. The results calculated from the absorption of the compound, which occurs at wavelength close to 269 nm, elucidated that microneedling was effective in increasing the retention of the active, increasing in 119% and 54% in the times of 15 and 30 minutes, respectively, in the most adjacent layers of the epidermis.

Keywords: Microneedling, retention, kojic acid.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano. Ela cobre e demarca o organismo, formando um tipo de blindagem e protegendo o corpo de fatores externos como a luz, a mudança de temperatura, os processos infecciosos, entre outros. Esse órgão tem como suas principais funções a proteção, a nutrição, a pigmentação, a transpiração, a defesa e a absorção, além de funcionar como reservatório de água, vitamina D e energia [3, 4, 23].

O sistema tegumentar também ajusta o fluxo de moléculas de água entre o interior e o exterior do organismo, permitindo também a absorção de pequenas moléculas lipofílicas e de baixo peso molecular. Contudo, na epiderme está localizado o estrato córneo que compõe a principal barreira de penetração cutânea de substâncias químicas e de microrganismos, sendo capaz de resistir a forças mecânicas [9, 21].

Dentre as camadas cutâneas, abaixo da camada epidérmica, encontra-se a derme, sendo formada por uma ampla multiplicidade de células, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos ligados à extensa organização de tecido conjuntivo denso. Acima da derme encontra-se a epiderme, composta por várias camadas de queratinócitos (95% das células) que, ao sofrerem o processo de queratinização, movem-se em direção à superfície por meio da camada basal, espinhosa e granulosa para a mais externa: a camada córnea ou o estrato córneo que vai constituir a epiderme não viável [1, 21].

Pesquisadores vêm evidenciando que a pele saudável pode ser utilizada como entrada de administração sistêmica ou como caminho para medicamentos e princípios ativos, mas também afirmam que a permeação de substâncias na pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocada em um sistema farmacêutico apropriado e do tipo de pele em que está inserindo determinado medicamento [17, 19].

É importante frisar que a administração de fármacos por via oral, na maioria das vezes, é responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar princípios ativos, devido ao efeito de primeira passagem hepática, além de apresentar outros efeitos indesejados. A via tópica não apresenta os referidos efeitos, portanto, surge como uma opção interessante no que diz respeito à perspectiva de potencializar ações terapêuticas [1].

Neste contexto, cabe ressaltar que a penetração do ativo através da pele pode ser afetada por inúmeras variáveis, como por exemplo: etnia, espessura do tegumento, temperatura, estado da pele, tempo de contato com o dispositivo transdérmico, grau de hidratação, concentração de lipídeos, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, pH, pré-tratamento da pele e propriedades físicas do penetrante [1, 19].

Partindo deste pressuposto, existem desafios importantes na administração tópica de agentes terapêuticos, sobretudo a beneficiar a total liberação e permeação dos princípios ativos por meio das camadas da pele, que se apresentam como barreiras à penetração destas moléculas [2, 19, 22].

Entre os mais novos métodos com potencial de ampliar a retenção e penetração cutânea de produtos, destaca-se o microagulhamento, que consiste em um procedimento em que causa micropuncturas no tecido tegumentar com o objetivo de ativar a indução percutânea. A partir dessa técnica ocorre a perda de integridade da barreira cutânea, tendo como finalidade a dissociação dos queratinócitos e a liberação de citosinas que resultam em vasodilatação dérmica e migração de queratinócitos para reparar o dano epidérmico [11].

Outrossim, busca-se evidências científicas que indicam que o microagulhamento pode ser associado com efetividade a distintas moléculas com atuação terapêutica. Dentro do campo das substâncias antioxidantes e despigmentantes com este potencial de associação, pode-se citar o ácido kójico [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona], produzido principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* e largamente empregado no tratamento das hiperpigmentações, conhecido também como agente antirosinase. Sua ação terapêutica deve-se à capacidade quelante do íon de cobre que proporciona uma inibição seletiva da tirosinase, enzima chave na cascata de produção das melaninas, e induz à redução da eumelanina e de seu monômero precursor chave; ele também possui ação antiirritante, hidrossolúvel, estável no intervalo de pH 3,0 - 5,0 e compatível com bases não-iônicas, podendo ser associado a outros despigmentantes como o ácido glicólico [8].

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a retenção e permeação do gel contendo ácido kójico 3% frente à aplicação de microagulhamento *in vitro*, para que, assim, possamos compreender em termos quantitativos a real eficácia do seu emprego terapêutico.

2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 Reagentes

Nos ensaios de permeação e retenção, as amostras utilizadas para a análise foram obtidas a partir do gel de hidroxietilcelulose associado ao princípio ativo do ácido kójico 3%.

2.2 Aplicação do microagulhamento *in vitro*

O aparelho de microagulhamento (Figura 1) utilizado para a pesquisa foi fornecido pela empresa Molior Ltda., sendo que as agulhas desse aparelho são da medida de 0,50 milímetros. Cabe ressaltar que nos grupos tratados com microagulhamento o rolo foi disposto sobre a pele por dez vezes no mesmo local em diferentes direções, sendo elas na horizontal, vertical e diagonal direita e esquerda seguindo Doddaballapur (2009) [6], imediatamente antes da aplicação do ácido kójico sobre a pele de suíno.



Figura 1 - Aparelho de microagulhamento

2.3 Análise da permeação do ácido kójico

O estudo de permeação do ácido kójico foi realizado a partir de uma célula de difusão vertical tipo Franz (Figura 2), com solução receptora seguindo os preceitos do FDA (*Food and Drug Administration*): água e álcool etílico 99,5% (Nuclear) 1:1. Com a finalidade de separar o meio doador do receptor, foi disposta uma pele suína previamente preparada [13]. É importante enfatizar que esta célula foi colocada dentro de um banho termostaticado com água aquecida a 37°C, a fim de simular a temperatura corpórea. Após isto, a amostra foi colocada sobre um agitador mecânico, pois dentro do compartimento receptor havia uma barra magnética no intuito de manter a homogeneidade da amostra [20].

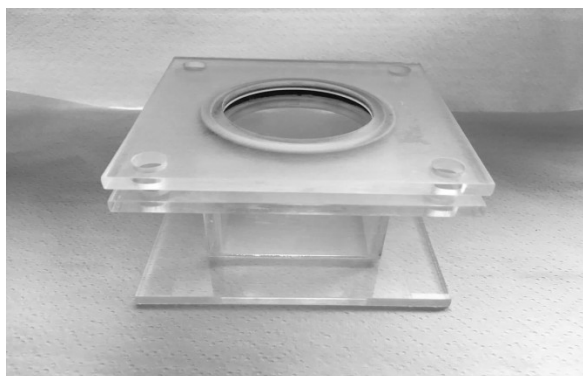


Figura 2 - Célula de difusão vertical tipo Franz.

Foram realizadas análises com e sem aplicação da técnica de microagulhamento a partir de varreduras espectrofotométricas de 190 a 990 nm, nos tempos de 15 e 30 minutos, cada tempo realizado em triplicada. A absorção do composto ocorre no comprimento de onda próximo a 269 nm como a região de absorbância máxima [7]. Os ensaios foram obtidos por meio de um espectrofotômetro Cary 100 Bio UV/Vis.

2.4 Análise de retenção ácido kójico através da biomembrana de pele de suíno

Para detectar a retenção *in vitro* do ácido kójico, foram utilizados os mesmos parâmetros da espectrofotometria supracitados, assim como os mesmos tempos e sistema de difusão vertical.

Nos ensaios de retenção foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por De Rosa *et al.* (2000) [5], para as análises na epiderme foi empregado o sistema de 12 fitas de 3cm de comprimento e 1cm de largura, sendo que a primeira foi descartada e as outras 11 foram utilizadas para a realização da análise. Todas foram posicionadas no mesmo local em que foi simulado um processo de “depilação” para realizar a retirada do extrato córneo. As fitas foram colocadas em um *becker*, ao qual foi misturada uma solução de 4mL de metanol com água (1:1), que foi posicionado no agitador magnético para manter a homogeneidade da amostra e, por fim, exposto a um banho termostatzado com água aquecida a 37°C durante 15 minutos.

Ainda, na avaliação de retenção na epiderme e derme, elas foram separadas e colocadas em distintos *beckers*. A elas também foram acrescentadas uma solução de 4mL de metanol com água (1:1) e, em seguida, foram posicionadas sobre o agitador magnético e expostas ao banho termostatzado com água a temperatura corporal de 37°C, durante 30 minutos.

2.5 Procedimentos para análise dos dados

Para a quantificação do ácido kójico foi construída uma curva de calibração, a partir de soluções de ácido kójico em solução de água e metanol (1:1) em diferentes concentrações de x e y %. A reta obtida é descrita pela equação $y=0,00608+537,95079x$ ($R^2=0,999$), a qual foi utilizada para determinar a concentração de ácido kójico nas amostras. Os resultados foram expressos em “±” erro padrão da média (EPM).

Para os parâmetros com dois grupos, foi utilizado o teste de *t* de Student. Em todos os casos, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

3. RESULTADOS

Inicialmente foi avaliada a retenção do ácido kójico a nível de extrato córneo, nos tempos de 15 e 30 min, em sistema de difusão vertical com e sem a aplicação da técnica de microagulhamento (Figura 3).

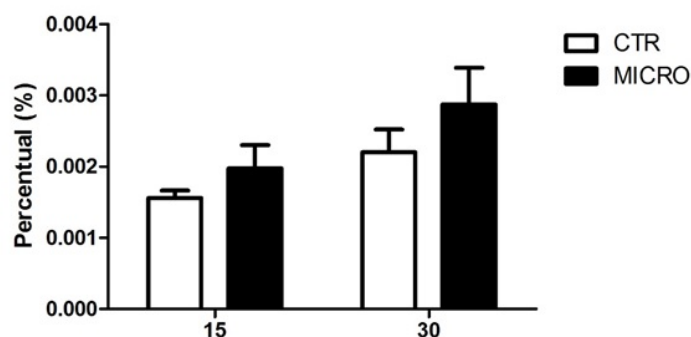


Figura 3 - Análise em percentual da retenção do ácido kójico no extrato córneo com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em \pm SEM. * $p < 0.05$ vs controle.

Conforme a figura 3 pode-se evidenciar que não existe diferença em termos de retenção do ácido entre os grupos comparados. Na sequência do estudo, avaliou-se a retenção do ácido kójico no restante das camadas da epiderme, conforme figura 4, se pode comparar nos tempos de 15 e 30 minutos o efeito do grupo microagulhamento com o grupo controle.

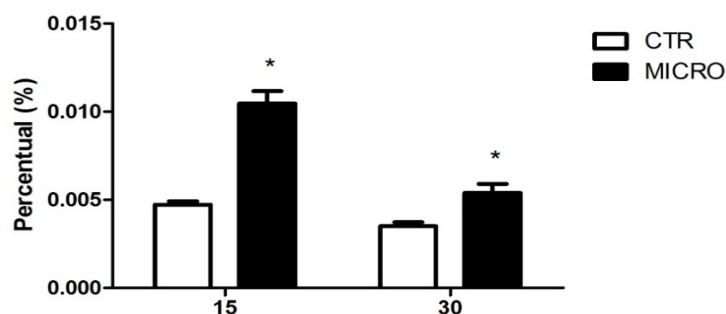
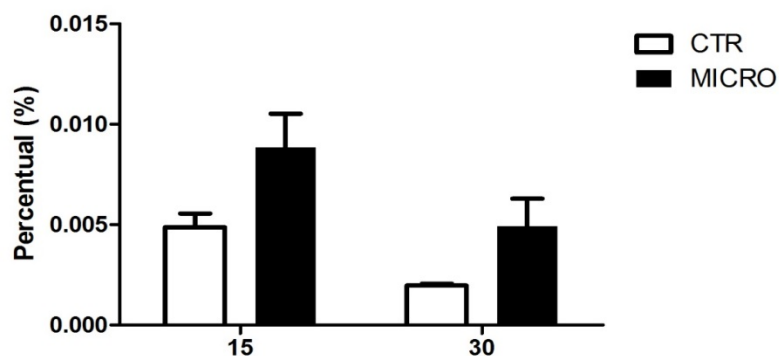


Figura 4 - Análise em percentual da retenção do ácido kójico na epiderme com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em \pm SEM. * $p < 0.05$ vs controle

Os resultados elucidados na figura 4 mostram que existe diferença em termos de retenção do ácido kójico na epiderme quando associado à técnica de microagulhamento, ou seja, o tratamento tem a capacidade de ampliar em 119% e 54% a retenção do ativo nos tempos de 15 e 30 minutos, respectivamente, quando comparado com o grupo controle.

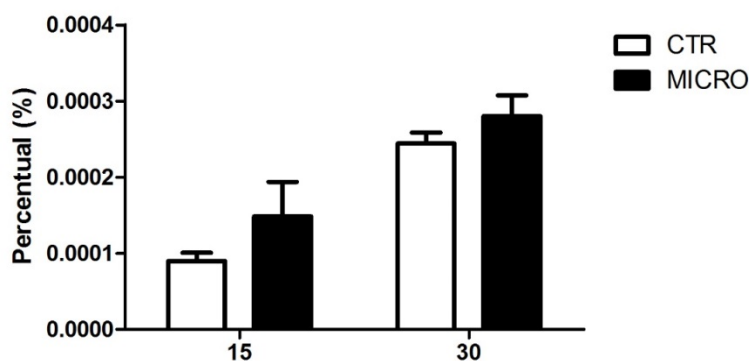
Por conseguinte, finalizando os ensaios de retenção, avaliou-se, conforme figura abaixo, a quantidade de princípio ativo retido na derme, nos tempos de 15 e 30 minutos com e sem a aplicação da técnica de microagulhamento.



*Figura 5 - Análise em percentual da retenção do ácido kójico na derme com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em \pm SEM. * $p < 0.05$ vs controle*

Pode-se observar que não existe diferença em termos de retenção do ativo na derme quando comparado o grupo controle e microagulhamento nos diferentes tempos.

Contudo, avaliou-se por fim, o potencial da técnica de microagulhamento em ampliar a permeação do ácido kójico para a solução receptora em sistema de difusão vertical nos tempos de 15 e 30 minutos, conforme apresentado na figura 6.



*Figura 6 - Análise em percentual da permeação do ácido kójico com e sem a utilização do microagulhamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Dados expressos em \pm SEM. * $p < 0.05$ vs controle*

Verificou-se a partir da interpretação da figura acima, que a técnica de microagulhamento não foi efetiva no que diz respeito a ampliar a permeação do ácido para o meio receptor, independentemente do tempo analisado.

4. DISCUSSÃO

A possibilidade de entregar princípios ativos terapêuticos para uma ação local ou até mesmo sistêmica tem feito da via transdérmica uma importante e promissora área para pesquisa, sobretudo, porque esta traz inúmeras vantagens em relação a outras, como por exemplo, diminuir as variações plasmáticas de fármaco, minimizar a frequência de administração, anular a variabilidade da absorção oral, possibilidade imediata de interromper a administração, entre outras [14].

Os referidos estudos buscam principalmente resolver a principal problemática de empregar substâncias no corpo humano, que é a impermeabilidade oferecida pelo sistema tegumentar. Neste sentido, avaliamos a permeação e retenção do ácido kójico a 3% frente ao microagulhamento que é um método de menor invasão que propõe um estímulo na produção de colágeno, sem provocar a desepitelização total observada nas técnicas ablativas [24].

Nossos resultados mostraram que a técnica neste modelo experimental tem a capacidade de ampliar a retenção do ativo na epiderme em 119% e 54% nos tempos de 15 e 30 minutos, respectivamente. Cabe ressaltar que nas demais análises de retenção, considerando estrato córneo e derme, e permeação, a técnica não se mostrou efetiva em incrementar os percentuais em comparação com os grupos controle.

A maioria dos recursos tópicos que são utilizados no tratamento de problemas dermatológicos tem como local de ação os tecidos mais profundos da pele. Assim, as moléculas necessitam permear o estrato córneo para chegar ao seu local de ação. Desse modo, a utilização clínica de fármacos por esta via está limitada pela capacidade de estes ultrapassarem a barreira da pele [14]. Contudo, o ácido kójico atua principalmente na epiderme, pois além de sua função antioxidante previamente descrita, ele tem como principal ação clínica o tratamento de hiperpigmentação cutânea, onde atua inibindo a síntese da tirosinase através da quelatação do íon de cobre, bloqueando a produção da melanina [25].

Até o momento, não existem, na literatura, investigações que compactuem com nossos resultados, evidenciando que microagulhas de 0,5 mm neste tipo de metodologia proposta tem a capacidade de ampliar a retenção de ácido kójico na epiderme. Entretanto, existem pesquisas associando a técnica a outras substâncias.

Kim et al. (2012) [10] referenciaram que o microagulhamento tem a capacidade de ampliar a permeação de certas substâncias pelo estrato córneo, inclusive com agulhas menores que 0,2 mm sem gerar excessivo quadro alérgico nos indivíduos. Seus resultados em modelo animal mostraram que a técnica tem a capacidade de ampliar a permeação do medicamento em questão, em função do tempo de análise e também do tamanho da agulha, ou seja, parece que microagulhas de 0,5 mm são mais efetivas que agulhas de 0,25 mm que, por sua vez, são melhores que as de 0,15 mm.

Uma pesquisa em modelo animal foi além e mostrou a efetividade terapêutica da associação do microagulhamento com a insulina. Com estreptozotocina os investigadores induziram a diabetes em ratos, ficando claro que a técnica foi capaz incrementar a permeação do medicamento, reduzindo de forma imediata em 80% os níveis de glicose sanguínea neste modelo experimental [12].

Teoricamente, os resultados desta pesquisa corroboraram com os estudos supracitados, podendo ser justificados a partir da hipótese de que a agulha tem a capacidade de promover a ruptura do estrato córneo, uma vez que isso já foi comprovado microscopicamente pela visualização dos canais e aumento da perda de água transepidermal. Este processo teria a capacidade de aumentar a permeação de moléculas hidrofílicas e macromoléculas das formulações aplicadas depois das perfurações pelo microagulhamento [18]. Foi visto que a aplicação de microagulhas permite a administração de moléculas de elevado peso molecular de maneira minimamente invasiva e segura [16].

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É consenso no âmbito da pesquisa e na prática clínica dos profissionais da área de saúde que a permeação transdérmica de ativos terapêuticos apresenta inúmeras vantagens em relação a outras vias de administração. Contudo, existe também a consonância de que a principal dificuldade está em superar a barreira do tegumento e entregar a molécula no tecido alvo.

Os resultados desta pesquisa mostraram que o microagulhamento neste modelo experimental não teve a capacidade de ampliar a permeação do ácido kójico para o meio receptor, porém foi efetivo em incrementar a retenção do ativo justamente no seu principal sítio de ação que é a epiderme, ou seja, as microagulhas de 0,5 mm facilitaram a permeação da molécula pelo estrato córneo e ampliaram em 119% e 54% nos tempos de 15 e 30 minutos, respectivamente a retenção da mesma nas camadas mais adjacentes da epiderme.

Por fim, cabe destacar que se tem discutido na atualidade não apenas o papel das microagulhas na entrega de medicamentos, mas também na produção de vacinas. Especialistas tem sugerido que há uma série de questões de segurança a longo prazo relativas ao seu uso, as quais precisarão ser abordadas para tal técnica avançar no âmbito da pesquisa [15].

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*, v.164, p. 26 - 40, 2012.
2. Badran MM, Kuntsche J, Fahr A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 36, n. 4-5, p.511-523, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2008.12.008>.
3. Bardini G, Lourenço D, Fissmer MC. Avaliação do conhecimento e hábitos de pacientes dermatológicos em relação ao câncer da pele. *ACM Arq Catarin Med*, v. 41, p. 56 - 63, 2012.
4. Castilho IG, Sousa MAA, Leite RMS. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. *An Bras Dermatol*, v. 85, n. 2, p. 173 - 8, 2010.

5. De Rosa FS. et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 261 - 269, 2003.
6. Doddaballapur S. Microneedling with dermaroller. *Journal Of Cutaneous And Aesthetic Surgery*, Bangalore, Karnataka, India, v.2, n. 2, p.110-111, 2009.
7. Gomara FL. Estudo de permeação cutânea in vitro do ácido kójico. 2003. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
8. Gupta K, Agarwal N. Assessment of response of microdermabrasion with 2% kojic acid in melasma. *Int J Res Med Sci*, v. 4, n. 6, p.1868 - 1872, 2016.
9. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes*, [s.l.], v. 1788, n. 11, p.2362-2373, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.015>.
10. Kim H. et al. Pharmacology and therapeutics: Transdermal drug delivery using disk microneedle rollers in a hairless rat model. *International Journal Of Dermatology*, South Korea, p.859-863, 2012.
11. Lima E, Lima M, Takano D. Microagulhamento: estudo experimental e classificação da injúria provocada. *Surg Cosmet Dermatol*, v. 5, n. 2, p. 110 - 4, 2013.
12. Martanto W et al. Transdermal Delivery of Insulin Using Microneedles in Vivo. *Pharmaceutical Research*, Usa, v. 21, n. 6, p.947-952, jun. 2004.
13. Martini PC. Avaliação da segurança e estudo da permeação e retenção cutânea de géis de ácido hialurônico. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Unesp, Araraquara, 2011.
14. Martins MRFM, Veiga F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Portugal, v. 38, n. 1, p.33-54, mar. 2002.
15. Quinn HL et al. The role of microneedles for drug and vaccine delivery. *Expert Opinion On Drug Delivery*, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1769-1780, 14 jul. 2014.
16. Reis TA et al. Microagulhas: estado da arte e aplicações médicas. *Brasília Med*, Brasília, v. 51, n. 2, p.159-168, 2014.
17. Sato MEO et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, 2007.
18. Schuetz YB et al. Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs. *Expert Opinion On Drug Delivery*, [s.l.], v. 2, n. 3, p.533-548, maio 2005.
19. Silva JA. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n. 3, p. 125 - 131, 2010.
20. Sinigaglia G et al. Iontoforese associada ao princípio ativo ácido ascórbico: Avaliação de difusão vertical "in vitro". *Scientia Plena*, Lajeado, v. 10, n. 04, p.1-8, 02 abr. 2014.
21. Soares M. et al. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 3, 2016.
22. Teichmann A et al. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, [s.l.], v. 67, n. 3, p.699-706, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.04.006>.
23. Tofetti MHFC, De Oliveira VR. A importância do uso do filtro solar na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele. *Investigação*, v. 6, n. 1, 2015.
24. Tuan-Mahmood T et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 50, n. 5, p.623-637, dez. 2013.
25. Um S et al. Synthesis of new glycyrrhetic acid (GA) derivatives and their effects on tyrosinase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 11, n. 24, p.5345-5352, dez. 2003. Elsevier BV.